

In VNTR analysis, the frequency of copy number conversion at each locus remains unclear. The copy number was found to be changed at VNTRs 3232 and 3690 (Iwamoto *et al.*, 2007) when the cloned isolate was cultured for 7–23 months. Furthermore, one repeat difference has been reported at MIRU-26 (Savine *et al.*, 2002). In these cases, conversion of the copy number was found at a single locus. Other reports have described that the copy quantities of VNTR changed at multiple loci (Supply *et al.*, 2006; van Deutekom *et al.*, 2005). The frequency of conversion of tandem repeats depended on each locus. Therefore, the accumulation of data related to the stability of each locus is a task of pressing urgency.

The TB isolates without epidemiological links were clearly classified according to differences of VNTR profiles (Oelemann *et al.*, 2007). It is impossible to conclude whether two strains are derived from the same origin, or not, merely by VNTR analysis when a difference of copy number is observed in one or two loci. When more detailed typing is required in a survey IS6110 RFLP or other loci, including hyper-variable regions in the VNTR, might be used.

Molecular epidemiological analyses are useful both for transmission surveys and population-based retrospective studies. A recent report described that up to 14% of the strain clusters identified by IS6110 RFLP analyses might include false clustering (van Deutekom *et al.*, 2005). Apparently, true TB genotyping clusters are obtainable through VNTR analysis because it can analyse *M. tuberculosis* objectively when suitable loci are selected.

For the present PCR platform, analyses of 8 or 12 samples are convenient. Herein, we propose this 12-locus VNTR as a useful means for TB genotyping where Beijing strains are prevalent. This is one report proposing new VNTR loci for Beijing strains. These loci do not represent a final decision. Additional loci can be chosen for TB genotyping in VNTR analysis if further discrimination is necessary. In addition, when the four loci selected here (VNTRs 2074, 2372, 3155 and 3336) are added to 15-locus VNTR (Supply), both genotypes of Beijing and non-Beijing can be analysed.

In this report, we propose new combinations of loci for VNTR analysis for the Beijing family. Furthermore, this study shows that JATA (12) VNTR has higher discriminatory power than IS6110 RFLP. However, the stability of each locus in VNTR analysis remains unknown. To obtain accumulated data, additional experiments are necessary.

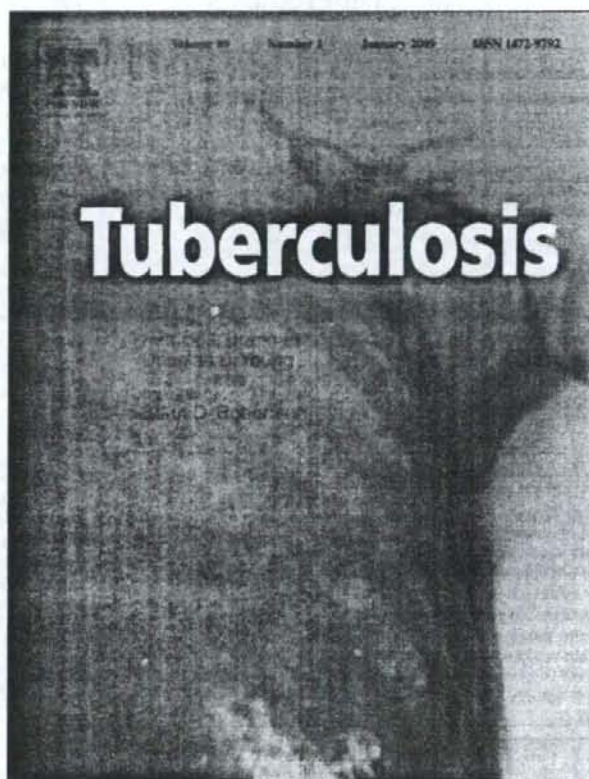
ACKNOWLEDGEMENTS

The authors sincerely thank the members of the Tuberculosis Research Committee (RYOKEN) for permission to use their TB isolates for this study. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Health Sciences Research Grants), the United States – Japan Cooperative Medical Science Program against Tuberculosis and Leprosy, and the Oyama Health Foundation.

REFERENCES

- Blackwood, K. S., Wolfe, J. N. & Kabani, A. M. (2004). Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *J Clin Microbiol* 42, 5001–5006.
- Cave, M. D., Eisenach, K. D., McDermott, P. F., Bates, J. H. & Crawford, J. T. (1991). IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes* 5, 73–80.
- CDC (2004). *Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control. Handbook for TB Controllers, Epidemiologists, Laboratorians, and Other Program Staff* — June 2004. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/tb/genotyping/manual.htm>.
- Cowan, L. S., Diem, L., Monson, T., Wand, P., Temporado, D., Oemig, T. V. & Crawford, J. T. (2005). Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 43, 688–695.
- Filliol, I., Driscoll, J. R., Van Soolingen, D., Kreiswirth, B. N., Kremer, K., Valétudie, G., Anh, D. D., Barlow, R., Banerjee, D. & other authors (2002). Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis* 8, 1347–1349.
- Frothingham, R. & Meeker-O'Connell, W. A. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144, 1189–1196.
- Glynn, J. R., Whiteley, J., Bifani, P. J., Kremer, K. & van Soolingen, D. (2002). Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 8, 843–849.
- Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26, 2465–2466.
- Iwamoto, T., Yoshida, S., Suzuki, K., Tomita, M., Fujiyama, R., Tanaka, N., Kawakami, Y. & Ito, M. (2007). Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* 270, 67–74.
- Kam, K. M., Yip, C. W., Tse, L. W., Wong, K. L., Lam, T. K., Kremer, K., Au, B. K. & van Soolingen, D. (2005). Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. *J Clin Microbiol* 43, 306–313.
- Kam, K. M., Yip, C. W., Tse, L. W., Leung, K. L., Wong, K. L., Ko, W. M. & Wong, W. S. (2006). Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett* 256, 258–265.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R. & other authors (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35, 907–914.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W. & other authors (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37, 2607–2618.
- Kremer, K., Glynn, J. R., Lillebaek, T., Niemann, S., Kurepina, N. E., Kreiswirth, B. N., Bifani, P. J. & van Soolingen, D. (2004). Definition

- of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol* 42, 4040–4049.
- Kremer, K., Au, B. K., Yip, P. C., Skuce, R., Supply, P., Kam, K. M. & van Soolingen, D. (2005). Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 43, 314–320.
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A. L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C. & Supply, P. (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1901–1906.
- Mostrom, P., Gordon, M., Sola, C., Ridell, M. & Rastogi, N. (2002). Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 8, 694–704.
- Nikolayevskiy, V., Gopaul, K., Balabanova, Y., Brown, T., Fedorin, I. & Drobniowski, F. (2006). Differentiation of tuberculosis strains in a population with mainly Beijing-family strains. *Emerg Infect Dis* 12, 1406–1413.
- Oelemann, M. C., Diel, R., Vatin, V., Haas, W., Rusch-Gerdes, S., Locht, C., Niemann, S. & Supply, P. (2007). Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 45, 691–697.
- Roring, S., Scott, A., Brittain, D., Walker, I., Hewinson, G., Neill, S. & Skuce, R. (2002). Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 40, 2126–2133.
- Savine, E., Warren, R. M., van der Spuy, G. D., Beyers, N., van Helden, P. D., Locht, C. & Supply, P. (2002). Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 40, 4561–4566.
- Skuce, R. A., McCorry, T. P., McCarroll, J. F., Roring, S. M., Scott, A. N., Brittain, D., Hughes, S. L., Hewinson, R. G. & Neill, S. D. (2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148, 519–528.
- Smittipat, N. & Palittapongarnpim, P. (2000). Identification of possible loci of variable number of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 80, 69–74.
- Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., Thong-On, A., Temu, M. M., Thanakijcharoen, P., Karnkawinpong, O. & Palittapongarnpim, P. (2005). Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 43, 5034–5043.
- Sonehara, T., Kawazoe, H., Sakai, T., Ozawa, S., Anazawa, T. & Irie, T. (2006). Ultra-slim laminated capillary array for high-speed DNA separation. *Electrophoresis* 27, 2910–2916.
- Sun, Y. J., Bellamy, R., Lee, A. S., Ng, S. T., Ravindran, S., Wong, S. Y., Locht, C., Supply, P. & Paton, N. I. (2004). Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol* 42, 1986–1993.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. & Locht, C. (2000). Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36, 762–771.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D. & Locht, C. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39, 3563–3571.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsche-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H. & other authors (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44, 4498–4510.
- van Deutekom, H., Supply, P., de Haas, P. E., Willery, E., Hoijing, S. P., Locht, C., Coutinho, R. A. & van Soolingen, D. (2005). Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* 43, 4473–4479.
- van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. & other authors (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31, 406–409.
- Wada, T., Maeda, S., Hase, A. & Kobayashi, K. (2007). Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Med Microbiol* 56, 1052–1057.
- Yokoyama, E., Kishida, K., Uchimura, M. & Ichinohe, S. (2007). Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. *Infect Genet Evol* 7, 499–508.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*

I. Sugawara^{a,*}, L. Sun^b, S. Mizuno^a, T. Taniyama^c

^a *Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022, Japan*

^b *Animal Biosafety Level 3 Laboratory, The Center for Animal Experimentation, Wuhan University, Wuhan, China*

^c *National Institute for Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2008

Received in revised form

3 September 2008

Accepted 24 September 2008

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Ag85A

Recombinant BCG

Rhesus monkey

SUMMARY

We have reported previously that recombinant BCG Tokyo (Ag85A) (rBCG-Ag85A[Tokyo]) shows promise as a tuberculosis vaccine, demonstrating protective efficacy in cynomolgus monkeys. As a next step, rhesus monkeys were utilized because they are also susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* and show a continuous course of infection resembling human tuberculosis. The recombinant BCG vaccine (5×10^5 CFU per monkey) was administered once intradermally into the back skin to three groups of rhesus monkeys, and its protective efficacy was compared for 4 months with that of its parental BCG Tokyo strain. Eight week vaccination of the monkeys with rBCG-Ag85A[Tokyo] resulted in a reduction of tubercle bacilli CFU ($p < 0.01$) and lung pathology in animals infected intratracheally with 3000 CFU H37Rv *M. tuberculosis*. Vaccination prevented an increase in the old tuberculin test after challenge with *M. tuberculosis* and reaction of *M. tuberculosis*-derived antigen. Thus, it was shown that even in rhesus monkeys rBCG-Ag85A[Tokyo] induced higher protective efficacy than BCG Tokyo.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) still remains a major health problem affecting millions of people worldwide. The only TB live attenuated vaccine currently available is *Mycobacterium bovis* BCG. However, the efficacy of BCG against adult pulmonary tuberculosis still remains controversial.^{1–4} Thus, development of a better TB vaccine is urgently required in order to counteract the global threat of TB.

Several TB vaccines are currently being tested using various models^{5–9} and several recent reviews have been published.^{10–13} These include recombinant BCG vaccine expressing Ag85B, recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing Ag85A, TB polyprotein vaccine, Mtb72f, ESAT-6 subunit vaccine, auxotrophic vaccines for TB, and recombinant BCG overexpressing major extracellular proteins (rBCG30). Although there have been few reports on the efficacy of TB vaccine candidates in cynomolgus monkey models due to the lower availability of monkey P3 facilities, a few papers have described the use of primate models. Vaccination of cynomolgus monkeys with Ag85B-ESAT-6 reportedly induces protective immune responses.¹⁴ DNA vaccine

(HSP65 + IL-12/HVJ) as well as 72f recombinant BCG provide better protective efficacy in cynomolgus monkeys.¹⁵

We have previously reported the protective efficacy of a TB DNA vaccine (Ag85A) and a recombinant strain BCG Tokyo (Ag85A) in small-animal models challenged with *M. tuberculosis* Kuroko strain.^{16,17} We found that recombinant BCG Tokyo was better than Ag85A DNA in terms of protective efficacy against *M. tuberculosis*.⁶ The spleen tissues from guinea pigs vaccinated with rBCG-Ag85A[Tokyo] or Ag85A DNA expressed IFN- γ and IL-2 mRNA at significantly high levels.⁶ This finding prompted us to explore further the efficacy of rBCG-Ag85A[Tokyo] in cynomolgus monkeys.¹⁸ We chose cynomolgus monkeys because this animal is reportedly protected more efficiently than rhesus monkeys by BCG vaccination.¹⁹ Previous studies have shown that whereas the rhesus macaque is highly susceptible to *M. tuberculosis*, the closely related cynomolgus macaque is more resistant.^{20–22} Thus, we thought that cynomolgus monkeys would be more efficiently protected by BCG vaccination than rhesus monkeys and therefore afford a good experimental model for the evaluation of new TB vaccine candidates. When we used cynomolgus monkeys, we found that rBCG-Ag85A[Tokyo] induced higher protective efficacy than the parental BCG Tokyo.¹⁸

There are still pros and cons for the experimental use of rhesus monkeys using BCG TB vaccines.^{19,21,23,24} Barclay et al. have reported that a high level of resistance to infection could be induced by BCG vaccine in the rhesus monkey, which in nature is highly

* Corresponding author. Tel.: +81 42 493 5075; fax: +81 42 492 4600.
E-mail address: sugawara@jata.or.jp (I. Sugawara).

susceptible to tuberculous infection. Janicki et al. have demonstrated high immune responses in rhesus monkeys after bacillus Calmette–Guerin vaccination and aerosol challenge with *M. tuberculosis*. However, Langermans' observation that BCG does not substantially protect rhesus monkeys from pulmonary *M. tuberculosis* infection contradicts earlier studies. It may be due to the higher *M. tuberculosis* challenge dose that he used to allow a direct comparison between cynomolgus and rhesus monkeys. There are few reports of the use of TB vaccines in rhesus monkeys.^{25,26} However, it is worth using rhesus monkeys in TB vaccination studies because cynomolgus and rhesus monkeys are closely related phylogenetically. As a next step, therefore, rhesus monkeys were utilized to see whether or not this rBCG-Ag85A[Tokyo] has promise as a TB vaccine. Even in cynomolgus monkeys, this vaccine induced higher protective efficacy than BCG Tokyo.

2. Materials and methods

2.1. Construction of recombinant (r)BCG Tokyo (rBCG-Ag85A[Tokyo])

rBCG-Ag85A[Tokyo] was constructed as described previously.¹⁸ Briefly, the Ag85A gene was amplified by PCR and subcloned into the pCR4 vector. The presence of the Ag85A gene was then confirmed by DNA sequencing. The gene was inserted into the pBBN vector (Ag85A-HA) possessing a hemagglutinin (HA) tag at its 5' end. At this stage, the Ag85A-HA was expressed in *E. coli*, and then the Ag85A-HA gene was introduced into the downstream region of the pHPS integration vector. The vector was then electroporated into BCG Tokyo. The resulting transformants (rBCG-Ag85A[Tokyo]) were cultured individually and the content of the extracted lysate that contains Ag85 protein was confirmed by Western blotting.¹⁷

2.2. Bacterial strain

Mycobacterium tuberculosis H37Rv (ATCC 25618) was passed through mice and grown once in 7H9 liquid medium before titration and storage in aliquots at -85°C . The culture strain was filtered through a membrane filter (4- μm pore size; Millipore, Bedford, MA, USA) before use to ensure even dispersal.

2.3. Monkeys

A total of 15 rhesus male monkeys (*Macaca mulatta*) (8–9 kg, 6–8 years old) were used. They were purchased from Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, China. All animals were housed at the animal biosafety level (ABSL) 3 facility of Wuhan University, Wuhan, China. The animals were studied in groups of three. Before the start of the studies, all animals were examined clinically and radiologically, and tuberculin skin-tested. For intratracheal challenge, animals were anesthetized with ketamine. Prior to commencement, the experiments were reviewed and approved by the Wuhan University ethics committee. We used a ketamine anesthetic for euthanasia.

2.4. Inoculation of monkeys

The monkeys were randomly assigned to three groups. Group 1 (three monkeys) received one intradermal injection of 5×10^5 CFU/ml rBCG-Ag85A[Tokyo]. Group 2 (three monkeys) received one intradermal injection of 5×10^5 CFU/ml BCG Tokyo. BCG Tokyo was kindly supplied by Dr. S. Yamamoto. Group 3 comprised of three unvaccinated monkeys that received physiological saline as a control.

The other six monkeys in three groups were followed up for 10 months to investigate long-term survival after vaccination and subsequent infection with H37Rv.

2.5. Intratracheal infection of monkeys

Eight weeks after vaccination, the animals were challenged by intratracheal instillation of 1 ml (3000 CFU) of H37Rv *M. tuberculosis*. All animals were challenged on the same day with the same preparation, and were then observed for 4 months after infection. As PPD (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) did not give better positive results for the monkeys, old tuberculin was used. The old tuberculin test (Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto, Japan) was carried out 1, 2 and 3 months after infection.¹⁸ Briefly, 0.1 ml of old tuberculin solution was injected intradermally into the left palpebral skin and 0.1 ml saline was injected intradermally into the right palpebral skin. Two days later, swelling and redness on both sides were compared and the diameter of redness was measured. All animals were housed in animal biosafety level (ABSL) 3 facilities.

2.6. Animal care

After infection, animals were observed daily by the animal caretakers for changes in behavior, eating and coughing. Weight, erythrocyte sedimentation rate (ESR) and temperature were recorded at times of blood sampling. Body temperature was measured rectally.

2.7. Immunological examination

Blood from the femoral vein was used to obtain serum. TB Dot assay (Shanghai Upper Biotech and Pharma Co., Shanghai, China) was carried out in accordance with the instruction sheet provided by the manufacturer to evaluate *M. tuberculosis* infection.¹⁸ This Dot assay detects 38 kDa antigen derived from *M. tuberculosis*.¹⁸

2.8. Bacterial enumeration

For the unvaccinated monkeys, 10 samples from the upper and lower lobes of the lung, and also spleen tissue, about 0.5 cm^3 in size were taken randomly at necropsy. For the vaccinated monkeys, 10 similar samples were taken randomly at necropsy. After being weighed, the samples were combined, homogenized and serially diluted with physiological saline. For the vaccinated groups, pyrazinamide (200 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) was added to determine BCG Tokyo-derived colonies (background count). To examine *M. tuberculosis*-derived colonies, the background count was subtracted from the number of colonies.¹⁸ The lung and spleen tissues were weighed and the results were expressed as CFU \pm SD/g organ.

2.9. Histopathology

As soon as the unvaccinated monkeys died, they were frozen immediately in a deep freezer. Necropsies were undertaken on the same day for the unvaccinated frozen monkeys and the vaccinated monkeys after euthanasia. The removed organs were fixed with 15% formalin for 10 days. Tissue sections from paraffin blocks containing lung, spleen, hilar lymph nodes and liver were stained with hematoxylin and eosin or the Ziehl–Neelsen method for acid-fast bacilli. The severity of pulmonary lesions was judged independently by two experts in a blind manner (I.S. and S.M.).

2.10. Statistical analysis

We performed analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements using the baseline results at screening as a covariate on log-transformed data to compare between groups.

3. Results

3.1. Clinical course

The rhesus monkeys vaccinated with rBCG-Ag85A[Tokyo] or parental BCG Tokyo and their non-vaccinated controls were infected intratracheally with H37Rv *M. tuberculosis*. Three rBCG-Ag85A[Tokyo]-vaccinated monkeys and two BCG Tokyo-vaccinated monkeys survived until the time of necropsy. Furthermore, when we followed up the rBCG-Ag85A[Tokyo]-vaccinated and BCG Tokyo-vaccinated monkeys (two/experimental group) for 10 months, only vaccinated monkeys survived till the time of necropsy. No coughing was observed in the animals after challenge. None of the vaccinated animals gained weight during the infection period. Their ESR was within the normal range (1–2 mm/h). None of the non-vaccinated animals showed an appreciable increase in body weight. Two of the monkeys (4 and 5) showed a gradual decrease in weight (50 g). The three non-vaccinated control animals showed a severe decrease in weight of 500–1000 g, and their ESR was higher than the reference value (18, 35 and 40 mm/h) (Table 1).

On radiographs of the chest, the non-vaccinated animals exhibited early development of multilobar pneumonia in the right lung and rapid progression to bilateral pneumonia. Lobar consolidation and atelectasis in the involved lungs and hilar lymphadenopathy were observed frequently in the non-vaccinated groups (Table 1).

In the vaccinated groups, pneumonia was slight to mild (Figure 1).

3.2. Immunological responses

Two immunological methods (the old tuberculin test and serum tuberculosis diagnosis) were utilized to clarify the severity of *M. tuberculosis* infection. In the vaccinated monkeys two months after infection, the old tuberculin test gave a positive result. In the non-vaccinated animals 1 day before death, the reaction was strongly positive and marked palpebral reddish skin swelling was observed and the sizes of redness were measured (Table 1).

The TB dot assay gave a negative result in all vaccinated and non-vaccinated animals 1 month after infection. However, 2 months after infection, the result was positive in the vaccinated monkeys, and strongly positive (2+) in the non-vaccinated monkeys (data not shown).

Table 1
Summary of the rhesus monkey experiments.

Monkey No.	Vaccination	Lung histopathology	ESR (mm/h, 2 months)	Sizes of old tuberculin (mm, 1 month)	Chest X-ray before death or necropsy
1	Rec BCG	Pneumonia Granulomas	2	13	Pneumonia
2	Rec BCG	Pneumonia	2	17	Pneumonia
3	Rec BCG	Pneumonia	2	12	Pneumonia
4	BCG Tokyo	Pneumonia Granulomas	2	15	Pneumonia
5	BCG Tokyo	Pneumonia Granulomas	1	18	Pneumonia
6	BCG Tokyo	Pneumonia	2	15	Pneumonia
7	Saline	Granulomas	35	31	Consolidation Pneumonia
8	Saline	Granulomas	18	28	Consolidation Pneumonia
9	Saline	Granulomas	40	37	Consolidation Pneumonia

Rec BCG; recombinant BCG.

3.3. Gross pathology and histopathology of the vaccinated and non-vaccinated monkeys

At necropsy, all unvaccinated animals showed extensive bilateral lung pathology characterized by the presence of multiple granulomas. These granulomas showed conglomeration to larger caseous areas, especially in the hilar region. Granulomas were also present in the liver and spleen. In the vaccinated animals, a few small granulomas were evident, but these showed no caseous changes. Small liver granulomas were not observed in the recombinant BCG-vaccinated monkeys, but were evident in BCG-vaccinated monkeys. One BCG-vaccinated monkey died after 59 days after infection, but the cause of death was not due to advanced tuberculosis at necropsy. Three non-vaccinated monkeys died of advanced tuberculosis 46, 49 and 58 days after infection. These were frozen just after death and necropsied for further examination.

On microscopic examination, the non-vaccinated animals showed multifocal, coalescing granulomas with central necrosis and pronounced cellular infiltrates in the periphery (Figure 2). The vaccinated animals showed markedly less severe histopathology. In particular, the peripheral inflammatory cell infiltration suggesting severe pneumonia was notably more pronounced in the unvaccinated than in the vaccinated animals. No multinucleated giant cells were recognized in the granulomas. Histological examination of the three animals that had received the recombinant BCG (Ag85A) showed almost normal lung tissue without granulomas in two of them. The remaining vaccinated animal showed a solitary small granuloma without central necrosis. Two BCG Tokyo-vaccinated animals showed a single small granuloma (Table 1). One BCG Tokyo-vaccinated monkey died 59 days after infection, but the cause of death was not due to advanced tuberculosis as evaluated by histological examination.

3.4. Replication of tubercle bacilli in the lung and spleen tissues of vaccinated and non-vaccinated monkeys

At autopsy, 10 different samples of lung and spleen tissue were taken for determination of CFU. Background culture CFU of BCG Tokyo or rBCG-Ag85A[Tokyo] after addition of pyrazinamide to the tissue homogenates was one or two. The lung tissue of animals vaccinated with recombinant BCG showed a significant 10-fold decrease in the number of bacteria compared with the non-vaccinated animals ($p < 0.01$). The number of CFU in BCG Tokyo-vaccinated animals after 16 weeks of infection was reduced 10-fold relative to that in the non-vaccinated animals ($p < 0.01$). There was a statistically significant difference in the number of pulmonary CFU between recombinant BCG-vaccinated and BCG Tokyo-vaccinated animals ($p < 0.01$) (Figure 3).

A similar tendency was also observed in the number of splenic CFU. The spleen tissues of animals vaccinated with recombinant BCG or BCG Tokyo showed a significant 100-fold or 10-fold decrease in the number of bacteria compared with the non-vaccinated animals ($p < 0.01$). There was also a statistically significant difference in the number of splenic CFU between recombinant BCG-vaccinated and BCG-vaccinated animals ($p < 0.01$).

4. Discussion

Although there are advantages and drawbacks to the use of rhesus monkeys for evaluation of TB vaccines, we have demonstrated that vaccination of rhesus monkeys with recombinant BCG (Ag85A) (rBCG-Ag85A[Tokyo]) induces protection against intratracheal infection with H37Rv *M. tuberculosis*. In addition to measurement of protection in terms of reduction of bacterial number and/or lung pathology, we have also shown that

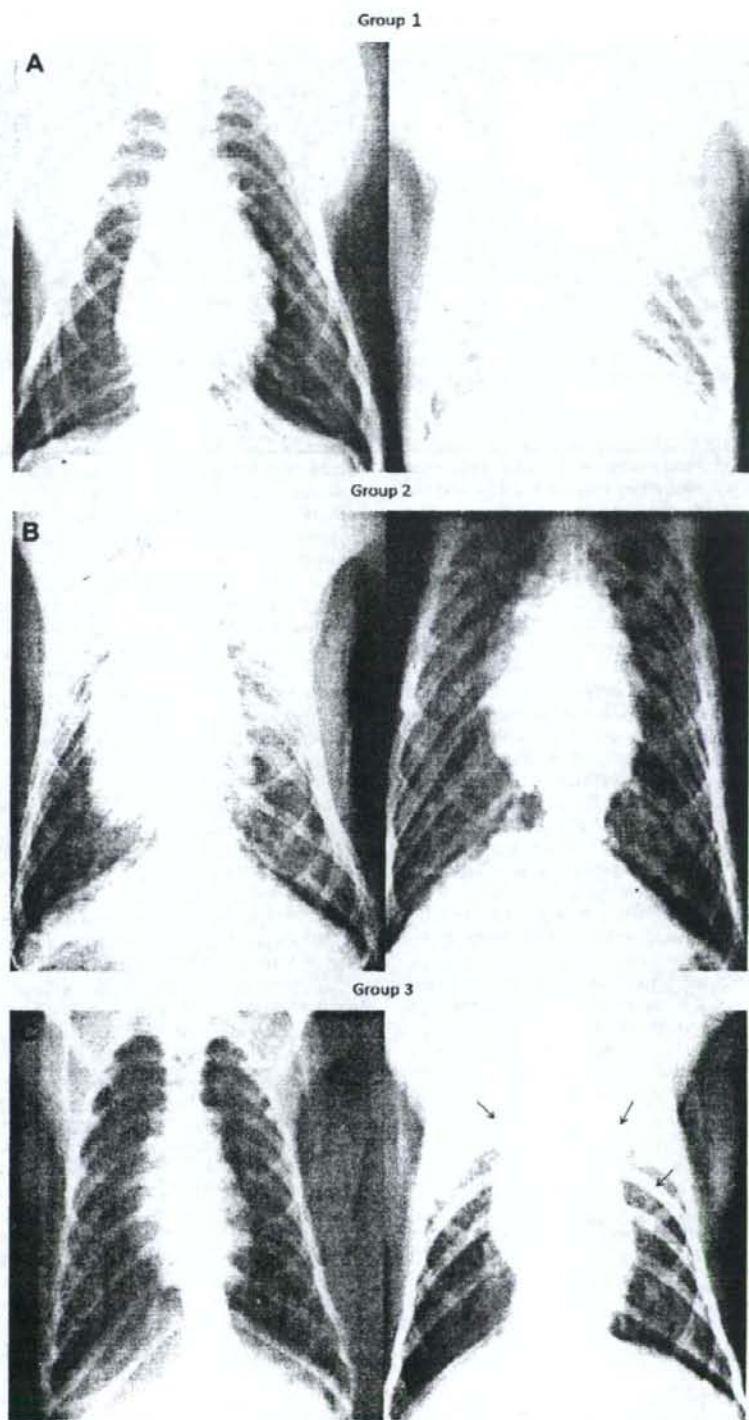


Figure 1. Chest radiologic examinations after challenge with H37Rv *M. tuberculosis*. (A) Rhesus monkey (No. 3) vaccinated with rBCG-Ag85A[Tokyo]. Left, before infection. Right, after infection. The chest X-ray picture (right) was taken 1 day before necropsy. (B) Monkey (No. 6) vaccinated with parental BCG Tokyo. Left, before infection. Right, after infection. The chest X-ray picture (right) was taken 1 day before necropsy. (C) Non-vaccinated monkey (No. 8) 2 days before death (right). Left, before infection. Right, after infection. After H37Rv challenge, the non-vaccinated monkeys rapidly developed extensive bronchopneumonia. Many nodular shadows (→) were recognized, but the vaccinated monkeys had negative chest X-ray findings 3 months after H37Rv challenge.

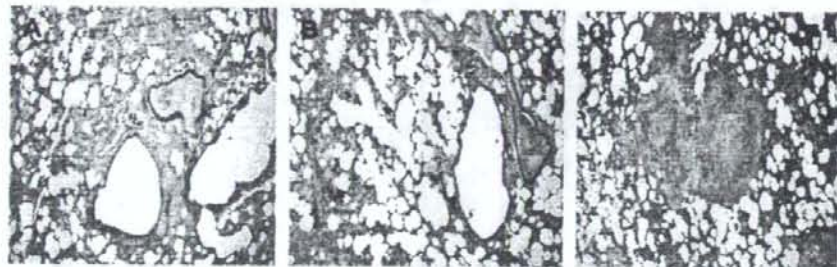


Figure 2. Histopathology of lung tissues from *M. tuberculosis*-infected rhesus monkeys vaccinated with rBCG-Ag85A[Tokyo] (A), BCG Tokyo (B) or non-vaccinated control which died 58 days after intratracheal infection (C) at necropsy. The granuloma with caseating necrosis are surrounded peripherally by a dense infiltrate of epithelioid macrophages and lymphocytes (C), but in the vaccinated monkeys interstitial pneumonia is evident (A and B). $\times 20$. Hematoxylin and eosin stain.

recombinant BCG vaccination prevented the development of a number of important clinical and immunological changes during infection. These changes included an increase of the ESR and the development of strong immune responses to a wide spectrum of mycobacterial antigens (old tuberculin). When we inoculated monkeys once with 5×10^5 CFU rBCG-Ag85A[Tokyo], there was a significant reduction of CFU in lung and spleen tissues compared to that in BCG Tokyo-inoculated monkeys.

When parental BCG Tokyo was used for vaccination, we found several grayish tubercles in the liver in two of six monkeys, but no such tubercles were evident in monkeys vaccinated with recombinant BCG. Moreover, there was a significantly lower number of CFU in lung tissues of monkeys vaccinated with recombinant BCG than in monkeys vaccinated with BCG Tokyo ($p < 0.01$). Taken together, the results suggest that the recombinant BCG bearing the introduced Ag85A gene gives better protective efficacy than BCG Tokyo. In order to evaluate the efficacy of the Ag85A antigen carefully, it was necessary to lower the dose of recombinant BCG. This time we used 5×10^5 CFU, which was one fourth of the dose used for cynomolgus monkeys. Again, rBCG-Ag85A[Tokyo] was effective in protecting against rhesus monkey tuberculosis.

In cynomolgus monkey experiments, many small nodules (macroscopically yellowish nodules) were seen throughout the entire lungs, indicating the presence of miliary tuberculosis. However, in rhesus monkeys, pulmonary consolidation with larger nodules was a major feature. It is suggested that rhesus monkeys are more susceptible to *M. tuberculosis* than cynomolgus monkeys. We carefully examined the lung histopathology of the vaccinated and non-vaccinated rhesus monkeys, but no multinucleated giant cells were observed. This is in sharp contrast to the previously

reported study.¹⁹ We have examined granulomas of mice, rats and guinea pigs infected with *M. tuberculosis*, but did not observe multinucleated giant cells except in IFN- γ -deficient mice infected with BCG Pasteur.²⁷ Although IFN- γ plays an essential role in formation of multinucleated giant cells, its exact role remains unknown.

The TB dot assay, which targets the 38 kDa antigen from *M. tuberculosis*, gave a negative result 1 month after infection, but a positive one 2 months after infection in rhesus monkey as well as cynomolgus monkey experiments. Therefore, care is needed when diagnosing tuberculosis in the early phase. The old tuberculin test may be more useful for diagnosis of early-phase TB. We were able to measure Ag85 antigen in sera of the rBCG-Ag85A[Tokyo]-vaccinated monkeys by ELISA (data not shown).

We selected Ag85A as a promising immunogen because the protein from *M. tuberculosis* induces significant humoral and cell-mediated immune responses.^{28,29} The expression levels of IFN- γ and IL-2 mRNAs were increased in spleen tissues from guinea pigs that had been vaccinated with parental BCG Tokyo, recombinant (r)BCG-Ag85A[Tokyo], and Ag85A DNA vaccine. Among them, the expression levels of IFN- γ and IL-2 mRNAs were the highest after vaccination with rBCG-Ag85A[Tokyo].¹⁷ Furthermore, the sera from the rBCG-Ag85A[Tokyo]-vaccinated guinea pigs were significantly reactive with the Ag85A peptide we used in our previous study (data not shown). We have shown previously that vaccination with Ag85A DNA twice by gene gun bombardment or with rBCG-Ag85A[Tokyo] once significantly reduced the severity of pulmonary pathology and the number of CFU in guinea pigs.^{16,17} When the immunogenic synthetic Ag85A peptide was further used as a booster together with recombinant BCG (Ag85A), lung pathology was improved significantly, together with a significant reduction in the number of pulmonary CFU.¹⁷ Although a single intradermal inoculation of 5×10^5 CFU BCG (Ag85A) was enough to induce protective efficacy in the present study, it would be desirable to use Ag85A peptide as a booster, Ag85B-ESAT-6 fusion protein and 72f fusion protein in combination with recombinant BCG Tokyo (Ag85A) to achieve much better protective efficacy.^{8,17}

Several promising TB vaccine candidates are now available after verification in monkey experiments. We plan to perform a global multicenter study of the TB vaccine thus chosen using the same experimental protocols after TB vaccine researchers have evaluated their TB vaccines and selected a promising one on the basis of consensus.

In summary, we have shown in a series of primate experiments that vaccination of primates (rhesus and cynomolgus monkeys) with rBCG-Ag85A[Tokyo] induces good protective immune responses. Using the rhesus monkey challenge model, further optimization of the dose should yield levels of protection that are better than those achieved with recombinant BCG.

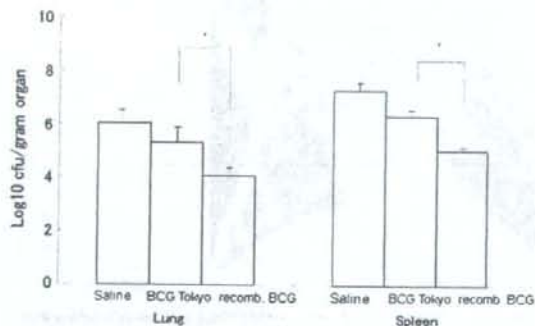


Figure 3. CFU counts in lung and spleen tissues per gram of H37Rv *M. tuberculosis*-infected rhesus monkeys vaccinated with BCG Tokyo or recombinant BCG Tokyo (Ag85A), and in non-vaccinated controls. * significant difference at $p < 0.01$.

Acknowledgements

Part of this study was supported by a grant for emerging and reemerging infectious diseases supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan (PI: Dr. Masaji Okada). We would like to thank Mr. Qiaoyan Xian and other laboratory staff at Wuhan University for their help and cooperation. Part of this work was presented at the 43rd US–Japan CMSP Tuberculosis and Leprosy Research Conference in Baltimore, US, in 2008.

Funding: Please see Acknowledgements.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Clemens JD, Chuong JJ, Feinstein AR. The BCG controversy. A methodological and statistical reappraisal. *JAMA* 1983;249:2362–9.
- Zodpey SP. The BCG controversy: a reappraisal of the protective effect against tuberculosis and leprosy. *Indian J Public Health* 2004;48:70–7.
- Haile M, Kallienius G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:211–5.
- Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG: implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:656–62.
- Chambers MA, Williams A, Hatch G, Gavler-Widen D, Hall G, Huygen K, et al. Vaccination of guinea pigs with DNA encoding the mycobacterial antigen MPB83 influences pulmonary pathology but not hematogenous spread following aerosol infection with *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun* 2002;70:2159–65.
- Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Mastesa-Galic S. Recombinant bacillus Calmette–Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13853–8.
- Skeiky YAW, Alderson MR, Ovendale PJ, Guderian JA, Brandt L, Dillon DC, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* 2004;172:7618–28.
- Brandt L, Skeiky YA, Alderson MR, Lobet Y, Dalemans W, Turner OC, et al. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *Infect Immun* 2004;72:6622–32.
- Guleria I, Teitelbaum R, McAdams RA, Kaplan G, Jacobs Jr WR, Bloom BR. Auxotrophic vaccines for tuberculosis. *Nat Med* 1996;2:334–7.
- Reed S, Lobet Y. Tuberculosis vaccine development; from mouse to man. *Microbes Infect* 2005;7:922–31.
- Dietrich J, Lundberg CV, Andersen P. TB vaccine strategies—what is needed to solve a complex problem? *Tuberculosis* 2006;86:163–8.
- Skeiky YA, Sadoff JC. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:469–76.
- Kaufmann SH, Baumann S, Nasser Eddine A. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:1068–79.
- Langermans JAM, Doherty TM, Vervenne RAW, van der Laan T, Lyashchenko K, Greenwald R, et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* 2005;23:2740–50.
- Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005;23:2132–5.
- Sugawara I, Yamada H, Udarawa T, Huygen K. Vaccination of guinea pigs with DNA encoding Ag85A by gene gun bombardment. *Tuberculosis* 2003;83:331–7.
- Sugawara I, Udagawa T, Taniyama T. Protective efficacy of recombinant (Ag85A) BCG Tokyo with Ag85A peptide boosting against *Mycobacterium tuberculosis*-infected guinea pigs in comparison with that of DNA vaccine encoding Ag85A. *Tuberculosis* 2007;87:94–101.
- Kita Y, Li Z, Sun L, Udagawa T, Taniyama T. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2007;87:518–25.
- Langermans JA, Andersen P, van Soolingen D, Vervenne RA, Frost PA, van der Laan T, et al. Divergent effect of bacillus Calmette–Guerin (BCG) vaccination on *Mycobacterium tuberculosis* infection in highly related macaque species: implications for primate models in tuberculosis vaccine research. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11497–502.
- Good RC. Biology of the mycobacterioses Simian tuberculosis: immunologic aspects. *Ann NY Acad Sci* 1968;154:200–13.
- Ribi E, Anacker RL, Barclay WR, Brehmer W, Harris SC, Leif WR, et al. Efficacy of mycobacterial cell walls as a vaccine against airborne tuberculosis in the Rhesus monkey. *J Infect Dis* 1971;123:527–38.
- Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, Abalos RM, Villahermosa LG, Young LJ, et al. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 1996;2:430–6.
- Barclay WR, Anacker RL, Brehmer W, Leif W, Ribi E. Aerosol-induced tuberculosis in subhuman primates and the course of the disease after intravenous BCG vaccination. *Infect Immun* 1970;2:574–82.
- Janicki BW, Good RC, Minden P, Afronni LF, Hymes WF. Immune responses in rhesus monkeys after bacillus Calmette–Guerin vaccination and aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 1973;107:359–66.
- Gormus BJ, Baskin GB, Xu K, Bohm RP, Mack PA, Ratterree MS, et al. Protective immunization of monkeys with BCG or BCG plus heat-killed *Mycobacterium lepro*: clinical results. *Leprosy* 1998;69:6–23.
- Attanasio R, Pehler K, McClure HM. Immunogenicity and safety of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins in non-human primates. *Clin Exp Immunol* 2000;119:84–91.
- Sugawara I, Yamada H, Kazumi Y, Doi N, Otomo K, Aoki T, et al. Induction of granulomas in IFN-gamma gene-disrupted mice by avirulent but not by virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 1998;47:871–7.
- Kamath AT, Feng CG, MacDonald M, Briscoe H, Britton WJ. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1999;67:1702–7.
- Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996;2:893–8.

世界の薬剤耐性結核の現状と迅速結核菌検査

Anti-tuberculosis drug resistance in the world and rapid diagnosis of tuberculosis

あ べ ちよじ
阿 部 千代治
Chiyoji ABE

モダンメディア別冊
第54巻8号 223～232 平成20年8月

世界の薬剤耐性結核の現状と迅速結核菌検査

Anti-tuberculosis drug resistance in the world and rapid diagnosis of tuberculosis

あべちよじ
阿部千代治
Chiyoji ABE

はじめに

結核菌の薬剤耐性は、結核菌遺伝子における自然の突然変異から由来し起こる。不規則な薬剤の供給（日本では考えられない）、不適切な処方、治療脱落の結果としての単剤治療は感受性菌の発育を押さえも耐性菌の増殖を許すことになる。以前には、この現象を獲得耐性 (acquired drug resistance) と呼んでいた (現在：既治療例の耐性)。薬剤耐性菌で感染を受けた場合は最初から薬剤耐性の病気になる。この現象は初回耐性 (primary drug resistance) と呼ばれていた (現在：初回治療例の耐性)。

1980年代後期から1990年代初期にかけて米国やヨーロッパでHIV感染者の間の多剤耐性結核菌による集団感染が国際的に注目を浴びた¹⁻³⁾。主要薬剤であるイソニアジド (INH) とリファンピシン (RFP) の両者に耐性を示す場合を多剤耐性結核 (MDR-TB) と定義しており、多剤耐性菌の発生は結核対策に対する脅威である。多剤耐性菌に感染した患者は治療が非常に困難であり、より強力で高額な治療費を必要とする。それゆえ、薬剤耐性は結核対策の国際的標準方式であるDOTS (Directly Observed Treatment, short course, 塗抹陽性患者について監視下短期治療) 戦略の潜在的脅威となる⁴⁾。1994年に世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は国際結核肺疾患予防連合 (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, IUATLD) やその他の国際機関と協力し、薬剤耐性結核の広がりを調べることを目的とし世界的規模の調査を開始した。一方、わが国では結核療法研究協議会が1957年から2~5年毎に全国規模で薬剤耐性結核の調査を行っ

てきた。ここではWHO/IUATLDにより進められている世界の薬剤耐性結核の調査成績⁵⁻⁸⁾、結核療法研究協議会による日本の薬剤耐性結核の調査成績^{9,10)}を紹介する。また多剤耐性結核の対策のために迅速な結核菌検査が要求されることから迅速な検査についても触れる。

I. WHO/IUATLD による 世界の薬剤耐性結核の調査

このプロジェクトの目的は標準的な方法を用いて薬剤耐性結核の頻度を測定することと、それぞれの国の耐性レベルと治療方式の関連を研究することである。薬剤耐性の調査は次の三つの点に焦点を合わせ進めている。

- 1) 調査は評価地域の結核患者を代表する標本に基づくこと。
- 2) 薬剤耐性のデータを正しく解釈するために未治療か既治療かを明確に区別すること。
- 3) 結核菌の相互交換を含む精度管理プログラムを実施し、検査室の精度を保持すること。

上述の初回耐性と獲得耐性の語は、1994年に作られた薬剤耐性結核の調査に関するWHO/IUATLDのガイドラインで調査の目的から推奨されたが、薬剤耐性の正確な状況を調べるのが困難であるため使用を中止すべきとの機運が高まり改訂され、第2報からは初回治療例の薬剤耐性 (drug resistance among new cases)、既治療例の薬剤耐性 (drug resistance among previously treated cases) と記載された⁶⁾。初回治療例とは、これまでに抗結核薬治療歴がない患者および1カ月以内の治療歴を持つ患者とした。既治療例とは過去に少なくとも1カ月以上の

治療歴を持つ患者であり、その中に再発例、治療失敗例、脱落後に戻った例、および慢性例が含まれる。

I-1. Supranational Reference Laboratory (SRL) ネットワークの確立と精度管理

得られた耐性頻度を比較する上で重要なことは世界の異なる検査室で行われている薬剤感受性検査法の精度を明らかにすることである。WHO/IUATLDのプロジェクトでは、WHOのそれぞれの地域内から1~3研究所をSRLとして選択し、SRLネットワークを確立し、SRLの間で精度管理研究を行うことからスタートした。スタート時点では、WHOの西太平洋地域からオーストラリア、韓国、日本（結核予防会結核研究所）の研究所が選ばれ、後に中国の香港特別区の研究所が加わった。WHOのReference Laboratoryから標準菌株をSRLに送り、ブラインドテストを行った。大多数のSRLが報告した判定成績（ゴールドスタンダード）と比較することにより検査精度が調べられた。感受性検査はINH、RFP、SM、EBの4薬剤で、これまでに13回の精度管理研究が行われた（表1）。感度は真の耐性菌の検出能、特異性は真の感受性菌の検出能、全体の一致率は正しい結果の数を総数で割った数値を表している。INHについては第2回目、RFPについては第7回と8回を除いて一貫して感度、特異性、一致率とも良い成績であった。低い成績を示した菌株のMIC値を測定したところ、検査濃度の近辺にMIC値を持つ菌株であることが明らかになり、第9回目からはSRL内での一致率が80%以下の菌株は精度の計算から除外された。SRL間で初回にみられた低い感度はSMとEBに対する検査の不完全さによる結果であり、3回目以降では検査法が改善された。特にEBに対する検査の感度は66%から90%に上昇した⁵⁻⁸⁾。

調査に直接携わっているNational Reference Laboratories (NRLs)の精度管理のためにSRLから標準菌株をNRLsに送付し、ブラインドテストを行った。また分離株の一部をSRLに送り再検査する方法もとられた。INHとRFPに対する検査の感度と特異性はSRLネットワーク同様に高かった。SMとEBに対する検査の感度は、初期の調査では比較的低かったがSRLネットワークでみられたようにNRLsでも後には改善されてきた。

表1 Supranational Reference Laboratory
ネットワーク内の外部精度管理試験成績 (%)

	年	回	Lab数	INH	RFP	SM	EB
感 度	1994	1	16	99	94	89	66
	1995	2	19	94	99	92	75
	1996	3	20	97	98	96	90
	1997	4	23	100	99	91	97
	1998	5	23	100	99	97	95
	1999	6	25	100	100	87	92
	2000	7	25	100	88	85	89
	2001	8	25	99	90	97	83
	2002	9	20	99	100	87	96
	2003	10	21	100	99	97	92
	2004	11	23	100	100	99	96
	2005	12	26	99	98	92	95
	2006	13	26	100	100	98	93
特 異 性	1994	1	16	100	97	100	98
	1995	2	19	86	99	82	84
	1996	3	20	100	100	91	96
	1997	4	23	100	99	96	89
	1998	5	23	99	99	89	98
	1999	6	25	99	93	99	96
	2000	7	25	99	99	99	92
	2001	8	25	98	90	96	98
	2002	9	20	99	99	91	98
	2003	10	21	99	98	98	99
	2004	11	23	100	100	99	97
	2005	12	26	98	97	95	97
	2006	13	26	100	100	97	98
全 体 の 一 致 率	1994	1	16	99	96	92	91
	1995	2	19	93	99	90	81
	1996	3	20	98	99	93	94
	1997	4	23	100	99	93	91
	1998	5	23	99	99	92	97
	1999	6	25	99	98	93	95
	2000	7	25	100	95	82	91
	2001	8	25	99	90	97	91
	2002	9	20	99	100	89	97
	2003	10	21	99	99	98	97
	2004	11	23	100	100	99	97
	2005	12	26	98	98	94	97
	2006	13	26	100	100	98	97

I-2. 調査成績

I-2-1 世界的規模の調査のカバー率

1994年から2006年までに本プロジェクトは、世界の全人口の48%、報告された世界の結核例および塗抹陽性結核例の46%を説明する地域をカバーしたことになる（表2）。また参加国も116になり、これは55%に相当する。

これまでにWHO/IUATLDは4つの報告を出した。1998年の第1報は1994年から1996年までの3年間に行われた調査の結果、2000年の第2報は1996年から1999年までに行われた結果、2004年の第3報は1999年から2002年までに行われた結果、2008年の第4報は2002年から2006年までに行われた結果を含んでいる（表3）。

I-2-2. 初回治療例の耐性

調査年および治療歴別にみた薬剤耐性結核の頻度（中央値）を表3に示した。INH耐性は1999年~2002年の5.9%から2002年~2006年の8.3%、RFP

表2 WHO 地域別サーベイランス参加国の結核（地域内のカバー率），1994～2006

WHOの地域	全人口 (%)	全結核数	塗抹陽性結核	再治療例数	参加国数
アフリカ	370,004,932 50%	908,305	360,124 72%	106,025 84%	22
米州	854,140,969 96%	222,731	114,815 93%	21,725 96%	21
東地中海	208,660,622 39%	58,023	26,483 23%	1,581 14%	8
東ヨーロッパ	66,639,802 21%	99,990	30,855 29%	23,241 44%	13
中央・西ヨーロッパ	363,241,951 64%	46,408	13,102 55%	3,694 44%	27
南東アジア	318,224,322 19%	450,076	176,448 23%	43,123 17%	6
西太平洋	929,999,840 53%	724,012	391,784 52%	59,315 36%	19
世界	3,110,912,438 48%	2,509,545	1,113,611 46%	258,704 39%	116 55%

表3 世界の薬剤耐性結核の頻度 (%), サーベイ年および治療歴別*

	1994～1996			1996～1999			1999～2002			2002～2006		
	初回	既治療	全体	初回	既治療	全体	初回	既治療	全体	初回	既治療	全体
INH	7.3	29.7	9.2	6.2	19.6	8.1	5.9	14.4	6.6	8.3	20.0	9.3
RFP	1.8	17.4	2.7	1.2	12.0	2.2	1.4	8.7	2.2	2.1	12.8	3.0
SM	6.5	15.0	7.5	5.2	12.4	6.0	6.3	11.4	5.8	7.5	16.6	8.8
EB	1.0	6.1	1.5	0.6	5.9	1.2	0.8	3.5	1.3	1.4	7.7	1.8
4剤のいずれか	9.9	36.0	12.6	10.7	23.3	11.1	10.2	18.4	10.4	12.2	30.2	12.7
MDR	1.4	13.0	2.2	1.0	9.3	1.8	1.1	7.0	1.7	1.6	11.8	2.2
参加国数	35			53			62			83		
Setting数 (%)	35			58			77			93		
検査数	50,000			68,104			64,184			91,577		
カバー率**	16%			28%			20%			35%		

* WHO/IUATLD により企画された世界の薬剤耐性結核のサーベイランス成績

** 世界全体の塗抹陽性結核に対するサーベイランスのカバー率

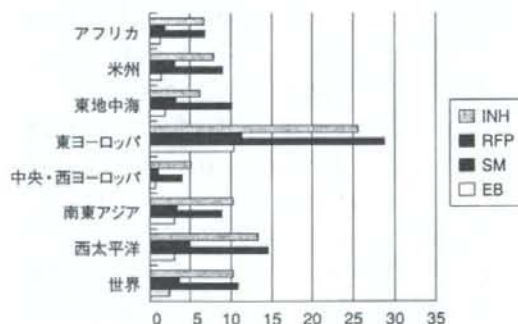


図1 初回治療におけるWHO地域別薬剤耐性結核の加重平均 1994～2006

耐性は1996年～1999年の1.2%から2002年～2006年の2.1%の範囲であった。また4薬剤のいずれか1剤に対する耐性は1994年～1996年の9.9%から2002年～2006年の12.2%の範囲、最も広がりを感じているMDRの頻度は1996年～1999年の1.0%から2002年～2006年の1.6%の範囲であった。WHOの地域別薬剤耐性結核の1994年から2006年

表4 初回治療におけるいずれかの薬剤耐性頻度が30%以上の地域, 2002～2007

国または地域	いずれかの耐性	MDR(高い順位)
Baku市(アゼルバイジャン)	56.3	22.3(1)
Tashkent(ウズベキスタン)	51.2	14.8(5)
ジョージア共和国	49.2	6.6(14)
モルドバ共和国	42.9	19.4(2)
Donetsk州(ウクライナ)	39.8	16.0(3)
アルメニア	37.5	9.4(10)
黒龍江省(中国)	36.1	7.2(13)
ラトビア	35.9	10.8(8)
Tomsk州(ロシア)	35.3	15.0(4)
内蒙古自治区(中国)	35.0	7.3(12)
グアテマラ	34.9	3.0
ヨルダン	32.4	5.4
ベトナム	30.7	2.7

までの加重平均値を図1に示した。旧ソビエト連邦を含む東ヨーロッパ地域の耐性頻度が世界の平均値や他の地域と比べ明らかに高値であった。いずれか1剤に対する頻度は世界の平均値17.0%に対し東ヨーロッパの35.8%、MDRは2.9%に対し10.0%であった。最新の調査成績(2002年～2006年)でいずれかの薬剤耐性頻度が30%以上の地域を表4に

示した。アゼルバイジャン、ウズベキスタン、ジョージア共和国では分離株の半数は一次抗結核薬のいずれかに耐性を持っていることになる。さらに、いずれかの薬剤に耐性頻度の高い地域ではMDRの頻度も高いことが分かる。またこれらの諸国の中に旧ソビエト連邦の国が多く含まれており、2002年～2006年の耐性頻度を高くしていることと関連がある。

I-2-3. 既治療例の耐性

試験例数に大きな差がみられた。これは大多数の地域では初回治療例の調査が終了した時点で既治療例の調査も終了していたことからきている。いずれかの薬剤耐性は1994年～1996年の36.0%から23.3%、18.4%と減少してきた。これは結核対策へのDOTS遂行の度合いと関連している。しかし、2002年～2006年の調査では30.2%に上昇した。このことは、表5に示したように初回治療例と同様に耐性頻度が高い東ヨーロッパ地域のサーベイランスが進められてきていることと関連している。特にウズベキスタンやアゼルバイジャンでは85%はいずれかの薬剤に耐性を持っており、55%以上がMDRである。アジア地域では、中国、ベトナム、タイもいずれかの既治療例の薬剤耐性頻度が50%以上であった。

I-2-4. 薬剤耐性結核の動向

3回以上の調査データを報告した国は50ある。米国と香港は全結核中のMDR頻度の動向について有意の低下、デンマークは初回治療例のいずれかの薬剤耐性の有意の低下、プエルトリコは全結核中のいずれかの薬剤およびMDR頻度の動向の低下、シンガポールは有意のMDRの低下を報告した。

表5 既治療例におけるいずれかの薬剤耐性頻度が50%以上の地域、2002～2007

国または地域	いずれかの耐性	MDR(高い順位)
Tashkent (ウズベキスタン)	85.9	60.0(2)
Baku市 (アゼルバイジャン)	84.4	55.8(3)
ヨルダン	83.3	40.0(10)
レバノン	75.0	62.5(1)
アルメニア	74.4	43.2(8)
モルドバ共和国	70.5	50.6(5)
Donetsk (ウクライナ)	70.2	44.3(7)
内モン自治区(中国)	70.1	41.9(9)
黒龍江省(中国)	67.5	30.4(14)
ジョージア共和国	66.0	27.4(16)
エストニア	63.4	52.1(4)
リトアニア	60.0	47.5(6)
ベトナム	58.9	19.3
グアテマラ	54.8	26.5(17)
ラトビア	52.7	36.3(12)
タイ	50.5	34.5(13)

バルト海地域のエストニアとラトビアは初回治療例のMDR頻度の動向は比較的一定であったが、リトアニアではわずかではあるが上昇してきている。これらの地域では結核の罹患率が順調に下がっている。エストニアでは年間減少率が8%、ラトビアでは6%、リトアニアでは5%であり、年間減少率とMDRの動向との間に関連がみられている。

ロシアのOrel州とTomsk州では、初回治療例のMDR頻度が有意に上昇していた。しかし、これらの地域の罹患率は緩やかに減少していた。Orel州の結核罹患率の年間減少率は3%、Tomsk州では1.3%である。なお、この時期の全ロシアの結核罹患率は一定である。韓国とペルーでもMDRの頻度の上昇がみられた。韓国の罹患率は、2003年までは順調に減少してきたが2004年ころから緩やかに上昇している。これは調査対象をプライベートセクターまで広げたことが理由と考えられる。一方ペルーでも2003年までは順調に罹患率が減少してきた。しかし2004年からはその減少が止まり、これは結核対策の弱体化を示唆している。

I-2-5. 薬剤耐性とHIV感染

いくつかのsettingsからHIV感染と薬剤耐性についてのデータが報告されている。しかし、HIV感染不明とHIV陰性の区別ができなことから分析は容易でない。分析可能な症例数を報告したのは2カ国であり、それはラトビアとウクライナのDonetsk州からである。2001年から2005年までのラトビアの調査では、HIV感染不明結核患者のMDRの割合は14.8%であったのに対し、HIV陽性患者のMDRは26.4%と有意に高値であった($P < 0.01$)。また2006年のウクライナの調査でも、23.8%に対し31.6%とHIV陽性者が有意に高い割合を示した($P < 0.01$)。

I-2-6. XDR-TB (Extensively drug resistant TB)

INHとRFP耐性に加え、fluoroquinoloneのいずれかと注射薬であるKM、AMK、CPMの中の1剤に耐性を示した場合をXDR-TBと呼ぶと定義されている。XDR-TBのデータは35カ国から報告された。中央・西ヨーロッパ、米州、アジア諸国から報告されたXDR-TB数は僅かである。これらの諸国ではMDR-TBの割合も比較的小さい。MDR-TB中のXDR-TBの割合は11カ国の0%から日本の30%の範囲である。問題はMDR-TB頻度の高い旧ソビエト

連邦諸国であり、9カ国から報告された。MDR-TB中のXDR-TBの割合は約10%、アルメニアの4%からエストニアの24%の範囲であった。XDR-TB問題を考えるとき、二次抗結核薬の検査についてはまだ精度管理が行われていないことから今後検査精度のチェックが必要である。

II. 結核療法研究協議会による 日本の薬剤耐性結核の調査

結核療法研究協議会は2～5年毎に全国規模で薬剤耐性結核の調査を行ってきた。対象は一定期間に結核療法研究協議会参加施設に入院した結核患者および非結核性抗酸菌症患者で菌が分離された例である。ここでは1997年と2002年に行われた調査^{*)}について記述する。

II-1. 参加施設と分析菌株数

1997年の調査に全国の73施設が参加し、計1,644例からの結核菌が分析された。これは保健所に届けられた菌陽性例の16.1%に相当する。1,644株の中で1,374株(83.6%)は初回治療例から分離された株であり、264株(16.1%)は既治療例から分離された株であった。2002年の調査には99施設が参加し、計3,122株の結核菌が分析された。これは菌陽性例の32.9%に相当する。3,122株の中で2,705株(86.6%)は初回治療例であり、417株(13.4%)は既治療例からであった。

II-2. 初回治療例と既治療例の耐性頻度

初回治療例についてみると、1997年の調査では主要4剤のいずれかに対する耐性頻度は10.3%、MDRは0.8%であった(表6)。SM耐性(7.5%)が最

も高く、ついでINH耐性、RFP耐性、EB耐性の順であった。WHO/IUATLDから報告された1996～1999年の中央値とほぼ同様の頻度であった。2002年の調査では、4剤のいずれかに対する耐性頻度は8.8%、MDRは0.7%であり、5年前の調査に比べいずれの薬剤に対する耐性頻度も低下していた(P<0.05)。

既治療例についてみると、1997年の調査でいずれかの薬剤に対する耐性頻度は42.4%、MDRは19.7%であった。また2002年の調査ではそれぞれ25.4%、9.8%であった。初回治療例に比べ有意に高い頻度であり、これらのことは初回治療が如何に大切かを物語っている。

1997年の調査で、初回治療例におけるRFP耐性菌の84.2%は複数の薬剤に対する耐性であり、63.2%はMDRであった。2002年の調査でも82.1%は複数の薬剤耐性であり、67.9%はMDRであった。これらのことは、RFP耐性を迅速に同定することが適切な治療をする上で重要であることを示唆している。

II-3. 薬剤耐性の動向と耐性に関する因子

薬剤感受性検査法が1996年に絶対濃度法から比率法に変わったことから、1996年以前のデータとそれ以降のものを単純に比較することはできない。1992年¹¹⁾と1997年の調査成績を比べたとき、INH 1 μ g/mlの検査でみると1.5%から2.5%に上昇していた。またRFPについてみると1992年の0.7%から1997年には1.4%に上昇していた。これらの上昇は検査法が変わったことからきた差であろうという意見もあるが、同じ検査法を用いた各施設の結果も上記の成績を支持している。しかし、5年後の2002年の成績では、前の項でも述べたようにいずれの薬剤に対する耐性頻度も1997年の調査と比べて大幅

表6 日本の薬剤耐性結核, サーベイランス年別

	1997			2002		
	初回治療	既治療	全治療	初回治療	既治療	全治療
INH	4.4	33.0	9.1	2.8	18.9	5.0
RFP	1.4	21.6	4.7	1.0	11.0	2.4
SM	7.5	24.2	10.3	7.0	14.4	7.9
EB	0.4	15.2	2.8	1.2	10.1	2.4
4剤のいずれか	10.3	42.4	15.5	8.8	25.4	11.0
MDR	0.8	19.7	3.9	0.7	9.8	1.9
XDR				0.2	2.9	0.5
参加施設数		78			99	
検査数	1,374	264	1,644*	2,705	417	3,122

*1,644例の中で6例は治療歴不明

の改善がみられている。2007年の調査は現在進行中であり、その結果を待ちたい。

薬剤耐性頻度に性別で差はみられない。また既治療例の約半数は高血圧、糖尿病、がん、肝炎、気管支拡張症などを合併しているが、合併症と高い既治療耐性との関連はみられない。わが国でRFPを医療基準に記載したのは1972年であり、抗結核薬の中では一番新しい薬剤である。1997年の調査では60歳以下の患者における初回治療例のRFP耐性は1.3%、60歳以上では1.4%でありほぼ同じ割合であることから、高齢者においてごく最近に再感染または新感染が起こっていることが示唆された。しかし、2002年の調査では60歳以下の1.3%に対し60歳以上では0.85%に低下していた。またINHとSMについても60歳以上では60歳以下と比べ有意に低い耐性頻度であった。このことは、60歳以上の高齢者の多くは再燃により発病していることを示唆している。1997年と2002年の2つの調査の違いがどこから来ているかについては今後検討する必要がある。

Ⅲ. 迅速な結核菌検査

前にも記述したように、薬剤耐性菌の広がりを押さえる上で迅速な結核菌の検査は重要である。

Ⅲ-1. 塗抹検査

臨床材料を塗抹し、抗酸菌染色を行い鏡検することが抗酸菌を検出する上で簡便で迅速な方法である。検出感度は分離培養法や核酸増幅法と比べて劣るが、患者発見の重要な手段の一つである。また排菌の有無ないしその程度を知ることは結核患者の管理や治療効果の判定の上で重要である。

これまでは患者材料を直接スライドガラスに塗抹する方法を用いてきた。一方欧米諸国では前処理後に遠心濃縮し集菌材料を塗抹する方法を取っている。わが国でも液体培地が普及し遠心集菌法が一般的になったことから、塗抹検査の精度を確保する意味からも遠心集菌材料を塗抹することを結核菌検査指針で勧めている^{12,13)}。

多くの検査室ではチール・ネールゼン法で染色している。検査室に出される検体の抗酸菌陽性率は数%である。残りの90数%は陰性であり、観察に多くの時間を要している(陰性材料については4～

5分)。蛍光法は観察が簡便であり、見落としが少ないことから使用を勧める。問題は抗酸菌以外にもしばしば蛍光を発するものがあり、読みすぎの恐れがあることである。200倍拡大で観察したとき数視野に1個あるいはそれ以下の場合はチール・ネールゼン法で確認する必要がある。蛍光染色法として、オーラミンO・ロダミン法、オーラミンO法、アクリジンオレンジ法¹⁴⁾がある。いずれの染色法を用いても塗抹検査の結果から抗酸菌種を同定することはできない。

Ⅲ-2. 培養検査

Ⅲ-2-1. 喀痰の前処理

新結核菌検査指針2000では検査材料の前処理法として、4%水酸化ナトリウム法に変えN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム(NALC-NaOH)の使用を勧めた。しかし、NALC-NaOH法のみでは抗酸菌以外の汚染率が高くなることが指摘され、結核菌検査指針2007ではNALC-NaOHによる汚染除去の前に蛋白分解酵素セミアルカリプロテアーゼ(SAP)処理が加えられた。この処理は同一の検体を一般細菌の培養に利用する場合にも利用される。2つの処理法を利用した前処理キットも市販されている。

Ⅲ-2-2. 液体培地

欧米諸国では選択培地の研究が進められ、最終的に5種の薬剤からなる抗菌補助剤が開発された。それらは、ポリミキシンB、アムホテリシンB、ナリジクス酸、トリメトプリム、アズロシリンの5種であり、頭文字をとりPANTAと呼ばれている。この研究は寒天培地や液体培地の開発に大きな貢献をした。現在わが国では次の4種の液体培地が市販されている：①用手法MGIT(Mycobacteria Growth Indicator Tube)と全自動BACTEC™MGIT 960、②バクテアラート3D、③KRD培地“ニチビー”、④二相性培地マイコアシッド。培地の組成には大きな違いはみられず、Middlebrook 7H9液体培地を基礎としたものである。それらシステムの違いは発育菌の検出方法にある。

Ⅲ-2-3. 臨床材料からの抗酸菌の分離

液体培地を基礎としたMGITおよびMB-Redoxを多施設で評価した成績を表7に示した¹⁵⁾。液体培地を用いることにより、培養可能な結核菌の約90%

表7 種々の培地による587喀痰材料からの抗酸菌の分離

分離菌 (n)	分離株数 (%)*					
	MB-Redox	MGIT	2%小川	MB-Redox +小川	MGIT +小川	MB-Redox +MGIT
結核菌 (133)	115 (86.5)	122 (91.7)	87 (65.4)	124 (93.2)	128 (96.2)	129 (97.0)
MOTT (70)	62 (88.6)	63 (90.0)	46 (65.7)	66 (94.3)	64 (91.4)	69 (98.6)
計 (203)	177 (87.2)	185 (91.1)	133 (65.6)	190 (93.6)	192 (94.6)	198 (97.5)

* 5施設の共同研究

** MOTT: 非結核性抗酸菌

を回収できるが、小川培地の分離率は66%と明らかに低い成績であった。液体培地と卵培地を組み合わせることにより、分離率を95%まで上げることができる。検査指針で液体培地と卵培地を1本ずつ用いることを推奨しているのはこのような結果からである。初回分離に3回とも両者を用いることが不可能な場合は、①1回両者+2回小川培地、②2回液体培地+1回小川培地など病院内で検討する必要がある。

液体培地による結核菌の検出までに要する平均日数は16日であったのに対し、小川培地ではそれより10日多く必要である(表8)。同様に非結核性抗酸菌についても、液体培地の11日に対し小川培地では19日必要である。米国のCDCは培養および鑑別・同定の結果を21日以内に担当医に報告すべきとしており、液体培地を用いることでその目標が達成される。

ここに成績は示さないが、他の液体培地の検出感度および検出までに要する日数はMGITおよびMB-Redoxと同等である。

III-3. 分離抗酸菌の迅速鑑別

結核菌と非結核性抗酸菌の早期の鑑別は患者管理と適切な治療のために重要である。結核菌群特異抗原であるMPB64をイムノクロマトグラフィーで検出するキャピリアTBキット^{16,17)}は簡便であり、液体培地と組み合わせることにより、迅速(培養液添加後15分以内)に結核菌と非結核性抗酸菌を鑑別でき有用である(図2, 表9)。

近年分子遺伝学が進歩し、抗酸菌菌種の同定に核酸の相同性や菌種特異領域を増幅する方法が開発され広く利用されるようになった。遺伝子を用いた検査は感度や特異性の点で優れた方法であるが、同定上有用な培養・生化学性状検査と併せて行い、それ

表8 抗酸菌の検出までに要した平均日数

分離菌 (n)	平均日数 (範囲)*		
	MB Redox	MGIT	2%小川
結核菌 (80)	16.1 (3~42)	15.9 (3~44)	25.7 (7~62)
MOTT (42)	11.0 (4~50)	10.5 (2~53)	19.4 (4~70)

* 3種の培地のすべてで陽性を示した例で比較した。
MOTT: 非結核性抗酸菌

表9 キャピリアTBによる液体培養からの結核菌群の迅速鑑別

分離菌 (n)	キャピリアTB	
	陽性	陰性
結核菌 (50)	50	0
MOTT (57)	0	57
混合培養 (1)*	1	0
計 (108)	51	57

MB RedoxまたはMGITで培養陽性を示した時点で培養の0.1mlを採取し、キャピリアTBで検査した。

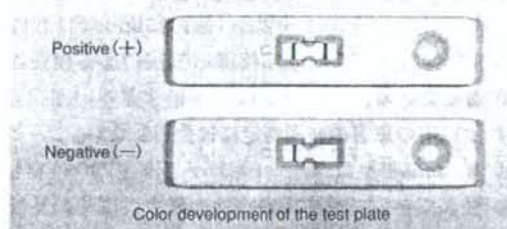
* 混合培養: 結核菌と *M. kansasii* の混合培養

図2 キャピリアTBによる結核菌群の鑑別

らの結果を総合的に判断することが必要である。

III-4. 核酸増幅法

感染症の迅速診断に核酸増幅法が用いられるようになった。結核菌のように増殖の遅い菌の検査には特に有用である。数社から核酸増幅キットが市販されており、キット間で感度と特異性を比較した成績や塗抹または培養法と比較した成績が報告されてい

表10 結核菌核酸増幅法の感度と特異性

報告者 (年)	MTD		Amplicor		BD Probe		ICAN		TRC		LAMP	
	感度	特異性	感度	特異性	感度	特異性	感度	特異性	感度	特異性	感度	特異性
Abe (1993)	91.9	100										
青木 (1994)			96.0	98.9								
Carpentier (1995)			86.0	98.0								
Ichiyama (1996)	100	99.3	97.8	98.9								
Wang (1999)	98.6	99.4	96.1	100								
Catanzaro (2000)	83.0	97.0										
Scarpato (2000)	85.7	100	89.7	100								
Bergman (2000)					93.8	99.8						
Piersimoni (2002)	88.0	99.2			94.5	99.6						
Iinuma (2003)			93.5	100	93.5	98.7						
倉島 (2003)			95.2	83.7			90.3	86.0				
Takakura (2005)			80.5	100					72.2	100		
Boehme (2007)											88.2	99.0
Pandey (2008)											100	94.2

MTD: Transcription-mediated amplification

Amplicor: Polymerase chain amplification

BD Probe: Strand displacement amplification

ICAN: Isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids

TRC: Transcription reverse-transcription concerted reaction

LAMP: Loop-mediated isothermal amplification

る(表10)。それらの感度と特異性にはキット間で差はみられず、検出感度は液体培地を用いた培養法と同等である。

核酸増幅法について、日本結核病学会治療・社会保険・抗酸菌検査法検討合同委員会は次のような使い方を勧めている¹⁸⁾。

- 1) 初回診断時に核酸増幅法による検査を1回保険診療で行うことができる。
- 2) 喀痰塗抹陽性の場合、患者管理のうえで結核菌か非結核性抗酸菌かを早急に鑑別する必要があり、検体入手後1~2日(施設によっては数時間)で結果が得られる核酸増幅法による検査は有効である。
- 3) 治療中の患者の経過判定には使用しない。
- 4) *M. avium*と*M. intracellulare*の検査についても触れている。結核菌が陰性の場合、多くの施設で塗抹陽性・陰性の別なく*M. avium*と*M. intracellulare*の検査が行われているが非結核性抗酸菌症の診断基準との関連を考えたときに塗抹陰性の検体の検査には使用すべきでない。

平成19年9月7日付厚生労働省から出された退院に関する基準で、異なった日の喀痰の培養検査の結果が連続して3回陰性、ただし3回目の検査は核酸増幅法の検査でも良いとしており、治療中の患者の経過判定には使用しないとされた日本結核病学会の見解と異なる考えが出された。これは保険診療でできるということを示しているものと思う。

Ⅲ-5. 薬剤感受性検査

分離された結核菌が抗結核薬に感受性であるかどうかは有効な治療薬の選択の上で重要である。1996年に日本結核病学会は結核菌の薬剤感受性検査法として小川培地を用いる比率法を提案した¹⁹⁾。米国のNCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 現 Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) は薬剤感受性検査に Middlebrook の寒天培地または液体培地の使用を勧めている²⁰⁾。結核菌検査指針2007では小川比率法に加え、BACTEC MGIT 960 ASTとマイクロプレートを用いるMIC法(プロスミックMTB-1)を取り上げた。MGIT 960 ASTと小川比率法の主要4薬剤の一致率は95%以上である(表11)^{21, 22)}。しかし、INHに対する検査で不一致の結果を示す株、すなわちMGIT 960 ASTで耐性・小川比率法で感受性の株がみられることが報告された。そこで全国各地で分離された結核菌1,112株を調べたところMGIT 960 ASTで96

表11 BACTEC™ MGIT 960 ASTの精度：
小川比率法との比較

薬剤	感度	特異性	全体の一致率
INH-低	100	93.4	96.7
INH-高	100	93.2	95.9
RFP	97.8	100	99.2
SM	91.3	100	96.7
EB	88.9	98.8	95.9

MGIT法で結果の判定までに要した平均日数：7日

表12 米国のATSおよびCLSIが推奨する非結核性抗酸菌の薬剤感受性検査

菌種	薬剤感受性検査
<i>M. avium</i> complex	抗結核薬に対する感受性検査は推奨しない。初回治療例にCAMの検査を推奨する。またマクロライドの治療に失敗した例はCAMの検査をすべきである。
<i>M. kansasii</i>	初回治療例にRFP感受性検査を行う。RFP耐性例ではRBT, EB, INH, CAM, FQ, AMK, SAなどを検査すべきである。
<i>M. marinum</i>	ルーチンの感受性検査は必要ない。数カ月治療後の失敗例についてのみ行う。
その他の速発育菌	現在推奨できる感受性検査法はない。
迅速発育菌	抗結核薬に対する感受性検査は行わない。 AMK, CFX, CAM, DOXY, FQ, IPM, Linezolid, SA, TOBなどの抗菌薬に対する検査を行う。

株、小川比率法で66株がINH耐性であり、30株は不一致であった²³⁾。CLSIが標準法としているMiddlebrook 7H10寒天培地を用いる比率法で調べたところ30株中28株(93.3%)は耐性であり、*katG*と*inhA*遺伝子の分析からもMGIT 960 ASTの信頼性が証明された²⁴⁾。他方、小川比率法で感受性検査を行っている施設では、INH感受性と判定された中に約2.9%はINH低レベル耐性菌が含まれることになる。このような低レベル耐性菌で感染を受けた潜在性結核の治療にINHの単独治療が有効かどうかを今後検討する必要がある。MGIT 960 ASTの感受性検査結果は5～10日で得られることから、液体培地を用いることによりすべての検査結果を30日以内に担当医に報告することが可能となった。

小川培地を用いる比率法は結核菌および*Mycobacterium kansasii*に対する抗結核薬の感受性を知るための検査法であり、*Mycobacterium avium* complexなど非結核性抗酸菌のための感受性検査法ではない。米国の胸部学会(American Thoracic Society, ATS)とCLSIが推奨している非結核性抗酸菌の感受性検査を表12に示した²⁵⁾。すなわち、*M. avium* complexについて、抗結核薬の検査は推奨せず、クラリスロマイシン(CAM)の検査のみを行う。*M. kansasii*については、RFPのみが臨床応答と関連していることからRFPの検査をする。また、迅速発育菌については、表11に示した抗菌薬の検査をすることを勧めている。

おわりに

1980年代の中期から1990年代の初期にかけて、米国で結核の罹患率が増加した。特にHIV感染に伴う結核は診断が難しいうえ、病気の進行が早い



図3 結核菌の検査に要する時間

こともあり、米国疾病管理センター(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)は検査室に迅速な結果報告を求めた^{26,27)}。その目標はつぎのようである。

- ①塗抹検査の結果を24時間以内に担当医に報告する
- ②結核菌群の分離と同定結果を21日以内に報告する
- ③薬剤感受性検査結果を30日以内に報告する

小川培地を用いた分離培養および薬剤感受性検査では②と③を満足させることができない。多くの施設で分離培養に液体培地を用いるようになり、②はクリアーできるようになった。また、薬剤感受性検査に液体培地を用いている施設ではすべてをクリアーできている(図3)。

検査の結果は患者管理や治療に直接結びつくことから、迅速性に加え、高い精度が要求される。結核菌の細菌学的検査の中で薬剤感受性検査は精度管理の最も難しい検査であり、精度の良し悪しは新たに耐性菌を作ることにもつながる。定期的な内部精度管理が求められる。

文 献

- 1) Centers for Disease Control (CDC): Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons - Florida and New York, 1988-1991. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 40: 585-591, 1991.
- 2) Dooley S, Jarvis WR, Martone WJ, Snider DE Jr: Mul-

- tidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Ann Intern Med. 117 : 257-259, 1992.
- 3) Snider DE Jr, Roper WL : The new tuberculosis. N Engl J Med. 326 : 703-705, 1992.
 - 4) World Health Organization : Treatment of tuberculosis : guidelines for national programmes. 3rd ed. WHO, Geneva, Switzerland, 2003.
 - 5) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. WHO/TB/97.229. WHO, Geneva, Switzerland, 1997.
 - 6) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No.2. Prevalence and trend. WHO/CDS/TB 2000.278. WHO, Geneva, Switzerland, 2000.
 - 7) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No. 3. WHO/HTM/TB/2004.343. WHO, Geneva, Switzerland, 2004.
 - 8) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance : Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No. 4. WHO/HTM/TB/2008.394. WHO, Geneva, Switzerland, 2008.
 - 9) Abe C, Hirano K, Wada M, Aoyagi T : Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line anti-tuberculosis drugs in Japan, 1997. Int J Tuberc Lung Dis. 5 : 46-52, 2001.
 - 10) Tuberculosis Research Committee (Ryoken) : Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan : a nationwide survey, 2002. Int J Tuberc Lung Dis. 11 : 1129-1135, 2007.
 - 11) Hirano K, Kazumi Y, Abe C, Mori T, Aoki M, Aoyagi T : Resistance to anti-tuberculosis drugs in Japan. Tuberc Lung Dis. 77 : 130-135, 1996.
 - 12) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会 : 新結核菌検査指針 2000. 結核予防会, 東京, 2000.
 - 13) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会 : 結核菌検査指針 2007. 結核予防会, 東京, 2008.
 - 14) 平野和重, 浜崎園望, 青野昭男, 阿部千代治 : アクリジンオレンジ抗酸菌蛍光染色液, アクリスティンの評価. 臨床と微生物. 30 : 105-109, 2003.
 - 15) 阿部千代治, 平野和重, 和田雅子, 蝶良英郎, 山中正彰, 青柳昭雄, 大角光彦, 武田政雄, 倉島篤行, 米山彰子, 奥住捷子 : 酸化還元インジケータを用いた抗酸菌培養システム MB Redox の評価. 結核. 74 : 707-713, 1999.
 - 16) Abe C, Hirano K, Tomiyama T : Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 37 : 3693-3697, 1999.
 - 17) Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C : Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 42 : 390-392, 2004.
 - 18) 日本結核病学会治療・社会保険・抗酸菌検査法検討委員会 : 新しい結核菌検査法の臨床での利用について. 結核. 75 : 681-684, 2000.
 - 19) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会 : 結核菌の薬剤感受性試験. 特に試験濃度変更と比率法導入への提案. 結核. 72 : 597-598, 1997.
 - 20) Clinical and Laboratory Standards Institute : Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic *Actinomycetes* ; approved standard. NCCLS document M-24A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2003.
 - 21) 阿部千代治, 青野昭男, 平野和重 : BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤感受性試験 : 固形培地を用いる比率法との比較. 結核. 76 : 657-662, 2001.
 - 22) Aono A, Hirano K, Hamasaki S, Abe C : Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA) : compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. Diagn Microbiol Infect Dis. 44 : 347-352, 2002.
 - 23) 御手洗聡, 小林郁夫, 阿部千代治, 和田雅子, 鈴木克洋, 高嶋哲也, 川辺芳子, 町田和子, 田野正夫, 瀧川修一, 鎌田有珠, 重藤えり子, 藤井俊司, 森健一, 須山尚史, 矢野修一, 川城丈夫, 尾形英雄 : バクテック MGIT 960 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST) および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討. 結核. 82 : 449-454, 2007.
 - 24) Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, Wada M, Kawabe Y, Takashima T, Suzuki K, Sng L-H, Wang S, Htay HH, Ogata H : Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. J Clin Microbiol. 46 : 2263-2268, 2008.
 - 25) American Thoracic Society Documents : An Official ATS/IDSA Statement : Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 175 : 367-416, 2007.
 - 26) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter IJ, Horsburg CR Jr, Good RC : The resurgence of tuberculosis : is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 31 : 767-770, 1993.
 - 27) Centers for Disease Control and Prevention : National plan for reliable tuberculosis laboratory services using a systems approach : Recommendations from CDC and the Association of Public Health Laboratories Task Force on Tuberculosis Laboratory Services. Morbid Mortal Wkly Rep. 54 : 1-12, 2005.